



REC'D 17 NOV 1999
WIPO PCT

1899/1719

EJU

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

COPIE OFFICIELLE

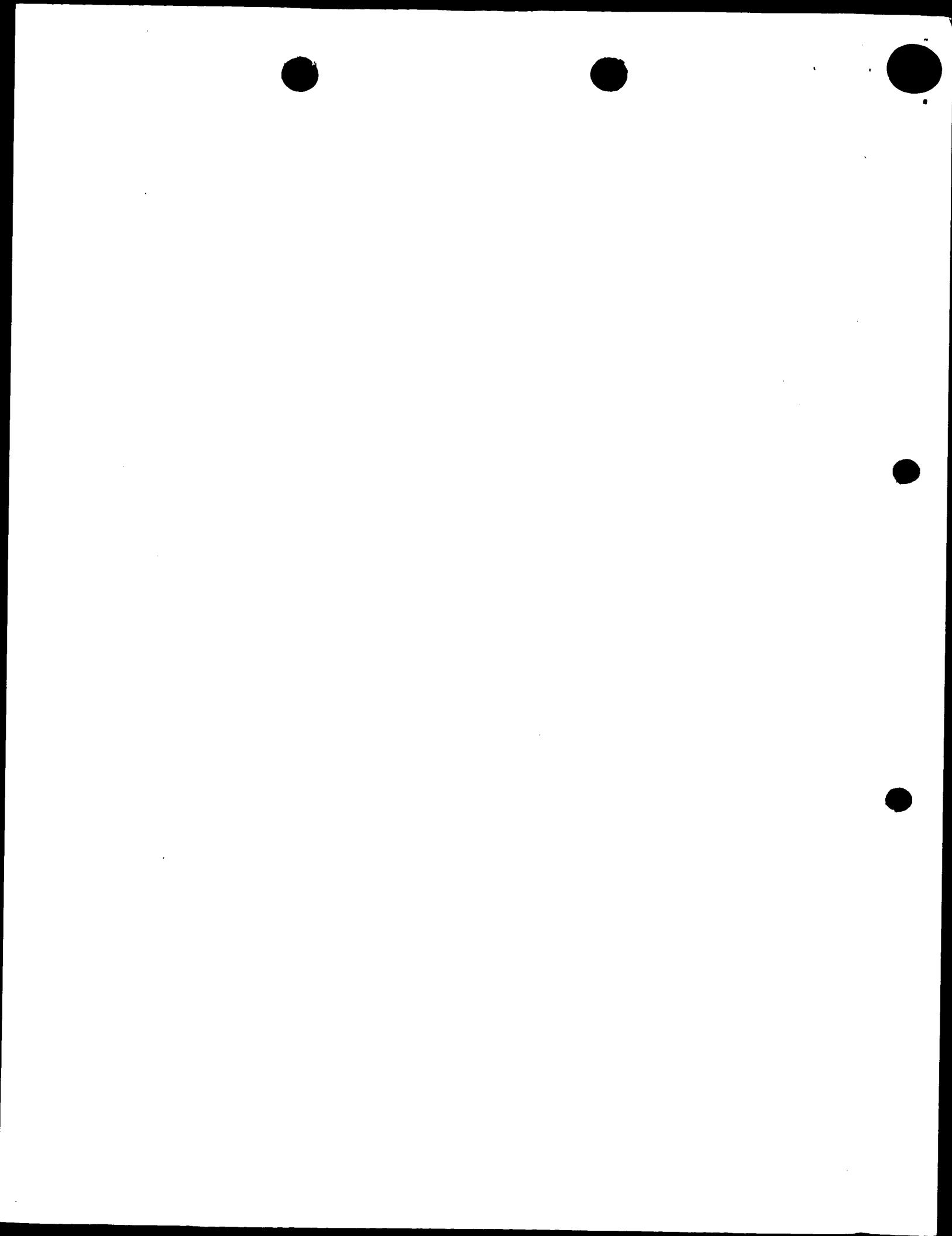
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 28 OCT. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 OCT. 1998**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 13283

DEPARTEMENT DE DÉPÔT **L7**

DATE DE DÉPÔT

20 OCT. 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire



certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen

brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06**

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
APL/MF/U04B3120FR 04 72 69 84 30

date

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

SEQUENCE D'ADNc DECRIE PAR SEQ ID N°1 TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR L'OXYDASE TERMINALE ASSOCIEE A LA BIOSYNTHESE DES CAROTENOÏDES

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénom, (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE 1)

Etablissement Public à Caractère Scientifique, Culturel et Professionnel

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Pays

Adresse (s) complète (s)

**CERMO - 460, Rue de la Piscine - Domaine Universitaire
38400 ST-MARTIN D'HERES**

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur bac à libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

**Dominique GUERRE
CPI 921104**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RECEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

A. CHAPELAN



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98.13283

TITRE DE L'INVENTION :

SEQUENCE D'ADNc DECRIE PAR SEQ ID N° 1 TRANSCRIVANT UN ARNm CODANT POUR
L'OXYDASE TERMINALE ASSOCIEE A LA BIOSYNTHÈSE DES CAROTENOÏDES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153
69466 LYON CEDEX 06
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

CAROL Pierre - Université Joseph Fourier - Génétique Moléculaire des Plantes - CERMO BP 53X - 38041 GRENOBLE CEDEX - FRANCE

KUNTZ Marcel - Université Joseph Fourier - Génétique Moléculaire des Plantes - CERMO BP 53X - 38041 GRENOBLE CEDEX - FRANCE

MACHE Régis - Université Joseph Fourier - Génétique Moléculaire des Plantes CERMO BP 53X - 38041 GRENOBLE CEDEX - FRANCE

COUPLAND George - John Innes Centre - Norwich Research Park - COLNEY NORWICH - NR4 7UH - GRANDE-BRETAGNE

STEVENSON David - Long Ashton Research Station - Long Ashton - BRISTOL - GRANDE-BRETAGNE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 13 Novembre 1998

Dominique GUERRE
CPI 921104

L'invention concerne une séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) décrite par SEQ ID N°1, transcrivant un ARNm (acide desoxy ribonucléique messager), lui-même codant pour l'enzyme OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoides) décrite par SEQ ID N°2, ainsi que des vecteurs de transformations de cellule, de plante ou fragment de plante, et le procédé pour modifier la production de caroténoides dans une plante.

Les caroténoides sont des pigments lipophiles synthétisés chez les plantes, les champignons et les bactéries. Dans les tissus photosynthétiques, les caroténoides ont une fonction de pigment accessoire d'absorption de la lumière et surtout de photoprotection contre les radicaux libres, tels que l'oxygène singulet.

Chez les plantes et certains micro-organismes, la voie biosynthétique des caroténoides produit des carotènes, des xanthophylles et leurs dérivés. Ces composés sont synthétisés à partir du phytoène qui est modifié par des réactions de déshydrogénéation successives pour produire du phytofluène, du zéta-carotène, du neurosporène puis du lycopène. Le lycopène s'accumule dans certain cas, donnant par exemple le pigment rouge de la tomate, ou plus généralement se retrouve sous forme modifiée par cyclisation, pour former de l'alpha- ou du bêta-carotène. Ces caroténoides cyclisés sont les précurseurs de la vitamine A, et peuvent s'accumuler ou donner, par des réactions d'oxydation, les xanthophylles, qui sont des pigments jaunes, roses, oranges ou rouges.

Les étapes de déshydrogénéation successives du phytoène sont catalysées chez la plupart des micro-organismes par une enzyme unique appelée phytoène désaturase CRTI. Chez les plantes et les cyanobactéries, deux enzymes apparentées existent. La première, appelée phytoène désaturase (PDS), catalyse la conversion du phytoène en phytofluène puis en zéta-carotène. La seconde, appelée zéta-carotène désaturase (ZDS), catalyse la

conversion du zéta-carotène en neurosporène puis en lycopène. Chacune de ces réactions de déshydrogénéation nécessite le transfert de deux électrons et deux protons du substrat vers un accepteur. Ces réactions de 5 déshydrogénéation nécessitent donc des enzymes, dites structurales, et des cofacteurs, qui sont des intermédiaires dans les réactions d'oxydoréductions.

Les inventeurs de la présente invention ont découvert un nouveau gène codant pour une enzyme appelée 10 OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoides), impliquée dans la biosynthèse des caroténoides. Il semble que cette enzyme soit placée dans les membranes des chloroplastes et soit indispensable au bon fonctionnement de la PDS.

15 Un premier objet selon l'invention concerne donc une séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID N° 1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour l'enzyme 20 OTBC (Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoides) décrite par SEQ ID N°2,
- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID N°1, telle que décrite ci-dessus, particulièrement par mutation et/ou addition et/ou 25 suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID N°2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC, ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique 30 équivalente à celle de l'OTBC représentée par SEQ ID N°2.

Le gène codant pour l'OTBC est une double hélice d'ADN, comprenant des introns et des exons. La séquence SEQ ID N°1 est le brin complémentaire (sans les introns) ou ADNc, correspondant au brin d'ADN transcrivant l'ARNm 35 codant pour l'OTBC.

Par activité enzymatique équivalente, on entend que l'enzyme, bien que pouvant être modifiée structurellement dans certaines de ses parties, est néanmoins capable de modifier son substrat. Son activité 5 est sensiblement la même que celle de l'enzyme native. On comprendra que cette enzyme ne peut pas être modifiée au niveau de son site actif. De ce fait, toute modification apportée à la séquence native, par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, s'entend 10 comme engendrant une activité enzymatique équivalente dans la mesure où l'activité de la protéine native n'est pas affectée par ces modifications.

Un second objet selon l'invention concerne une séquence d'ADN comprenant au moins une région codante 15 constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire représentée par SEQ ID N°1, cette séquence transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm transcrit par la séquence complémentaire de SEQ ID N° 1,

20 - la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm 25 mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID N°1.

30 Par ADN, on peut entendre ADN complémentaire (ou ADNc), c'est à dire la copie de l'ARNm sous sa forme d'ADN grâce à l'action d'une transcriptase inverse. L'ADNc ne comprend pas les introns des séquences d'ADN.

35 On entend par "capable de s'apparier" dans la présente invention, le fait que dans des conditions d'hybridations données, les séquences nucléotidiques

complémentaires s'apparent. L'homme du métier connaît bien, selon les conditions d'hybridation utilisées, quel est le pourcentage d'identité que les séquences doivent présenter pour qu'un appariement ou une hybridation puisse se réaliser. Les conditions de stringence pour obtenir un appariement de séquences voisines sont par exemple une hybridation dans 50% de formamide à 35°C. Pour ce qui concerne les conditions d'hybridation, on se réfèrera notamment à l'article "Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Sambrook, Fritch & Maniatis, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, USA".

On entend par " séquence nucléotidique modifiée " dans la présente invention, toute séquence nucléotidique présentant avec la séquence de référence un degré d'identité inférieur à 100%.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, les séquences nucléotidiques modifiées selon la présente invention comprennent approximativement au moins 70%, et mieux encore au moins 80% de nucléotides identiques à ceux de la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID N°1, ou de sa séquence complémentaire.

On entend par " identité de nucléotide ", la comparaison, lorsque les deux brins sont alignés , de la séquence des nucléotides identiques présents sur les deux brins. On obtient de ce fait, en ramenant au nombre de nucléotides totaux, le pourcentage de nucléotides identiques, c'est à dire l'identité de nucléotide.

Un troisième objet selon l'invention concerne un ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la définition du premier objet, et plus particulièrement transcrit à partir de la séquence d'ADN représentée par SEQ ID N°1, ledit ARNm codant pour l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID N°2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est équivalente à ladite enzyme dans la plante.

Un quatrième objet selon l'invention concerne un ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN selon le second objet de l'invention, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou 5 d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'apparier avec ledit ARNm.

Par "ARNm anti-sens", on entend une séquence d'ARN qui est complémentaire d'une séquence de bases d'un ARNm correspondant, complémentaire dans le sens que chaque 10 base (ou la majorité des bases) dans la séquence anti-sens (se lisant dans le sens 3' vers 5') est capable de s'apparier avec la base correspondante (G avec C, A avec U) dans la séquence d'ARNm se lisant dans le sens 5' vers 3'.

15 Un cinquième objet selon l'invention concerne une protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID N°2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou 20 substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou d'une séquence modifiée de l'enzyme, ledit fragment ou séquence modifiée présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

Un sixième objet selon l'invention concerne un 25 complexe formé entre un ARNm anti-sens défini dans le quatrième objet selon l'invention, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

Un septième objet selon l'invention est un ADN recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le 30 premier objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la 35 plante.

Par " séquence hétérologue " on entend, selon la présente invention, toute séquence pouvant être coupée par des enzymes, et servant de ce fait à insérer d'autres séquences présentant des activités diverses.

5 Un huitième objet selon l'invention est un ADN recombiné comprenant une séquence d'ADN définie dans le second objet selon l'invention, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens 10 capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

Un neuvième objet selon l'invention est un ADN recombiné défini dans le septième ou huitième objet selon l'invention comprenant les éléments nécessaires pour 15 contrôler l'expression de la séquence insérée, particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription desdites séquences.

Un dixième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour 20 augmenter la biosynthèse des caroténoides, comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique de SEQ ID N°1 comme définie dans le premier objet selon l'invention, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoides, représentée par SEQ ID N°2, 25 précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

Un onzième objet selon l'invention concerne un vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer 30 ou arrêter la biosynthèse des caroténoides, comprenant tout ou partie du brin de la séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°1 comme définie dans le second objet selon l'invention, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à 35 ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier

à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée dans la synthèse des caroténoides.

L'invention peut donc être utilisée pour modifier la synthèse des caroténoides, par exemple augmenter ou diminuer, voire arrêter, la production des couleurs associées à la déshydrogénéation du phytoène. Par exemple, l'inhibition de la couleur rouge dans les fruits tels que les tomates, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence anti-sens, donne un fruit d'une couleur attrayante se rapprochant du jaune, comme celle de certains poivrons. Il existe déjà des tomates jaunes de cette sorte, mais la présente invention fournit un moyen de transférer la caractéristique couleur dans des lignées, sans qu'un programme de reproduction prolongé ne soit nécessaire et puisse de ce fait engendrer l'altération d'autres caractéristiques de la plante.

L'augmentation de la synthèse des caroténoides, par transformation avec un vecteur comprenant une séquence sens, peut permettre de produire des tomates de couleur plus rouge, ce qui peut apparaître plus appétissant au consommateur. L'invention peut également servir à introduire une couleur rouge à l'intérieur d'une plante, ailleurs que dans le fruit. L'augmentation de la synthèse des caroténoides dans une plante peut être effectuée en 25 insérant une ou plusieurs copies fonctionnelles du gène d'ADN complémentaire, ou le gène complet, sous contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules de plantes.

Les vecteurs de transformation des plantes pour diminuer ou arrêter la synthèse des caroténoides, c'est à dire les vecteurs anti-sens, peuvent être très courts. Dans un mode de réalisation préférentiel, on choisira des séquences de bases homologues ayant une longueur d'au moins 10 bases. Il n'existe pas de limite supérieure théorique à la séquence de base, elle peut être aussi 35 longue que l'ARNm produit par la plante. Dans un mode de

réalisation très préférentiel, on utilisera cependant des séquences de longueur comprise entre 100 et 1000 bases.

Nous savons que les plantes mutantes chez qui le gène OTBC est inactif présentent un aspect panaché, les 5 plantes sont vertes et blanches. Nous proposons une application de la stratégie antisens, qui vise à éliminer la production d'ARNm et donc de protéine OTBC, qui viserait à produire des plantes au feuillage panaché comme par exemple des plantes ornementales, de type Nicotiana ou 10 Pétunia ou toute autre plante ornementale, qui se prête à la transformation génétique et qui pourrait recevoir une construction anti-sens dans le but d'empêcher la production de la protéine OTBC.

Les produits de recombinaison d'ADN peuvent être 15 fabriqués en utilisant des techniques standards. Par exemple, la séquence d'ADN à transcrire peut être obtenue en traitant un vecteur contenant ladite séquence avec des enzymes de restriction pour couper le segment approprié. La séquence d'ADN de transcription peut également être 20 engendrée en cyclisant et liant des oligonucléotides synthétiques ou en utilisant des oligonucléotides synthétiques dans une PCR (polymerase chain reaction) pour engendrer des sites de restriction à chaque extrémité. La séquence d'ADN est alors clonée à l'intérieur d'un vecteur 25 contenant une séquence promotrice d'initiation et une séquence de terminaison. Si l'on désire obtenir une séquence d'ADN anti-sens, le clonage sera effectué de manière à ce que la séquence d'ADN coupée soit inversée par rapport à son orientation dans le brin duquel elle a 30 été coupée.

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN anti-sens, le brin qui était initialement le brin matrice devient le brin codant, et vice versa. Le produit de recombinaison transcrira de ce fait un ARNm dont la 35 séquence de base est complémentaire de tout ou partie de la séquence de l'ARNm de l'enzyme. De ce fait, les deux

brins d'ARN sont complémentaires non seulement dans leurs séquences de bases mais également dans leur orientation (5' vers 3').

Dans un produit de recombinaison exprimant un ARN 5 sens, la matrice et les brins transcrits gardent l'orientation du gène initial de la plante. Les produits de recombinaison exprimant de l'ARN sens transcrivent un ARNm ayant une séquence de base qui est homologue en tout ou partie avec la séquence de l'ARNm. Dans les produits de 10 recombinaison exprimant l'enzyme fonctionnelle, la région codante complète du gène est reliée à des séquences de contrôle de la transcription capables de s'exprimer dans la plante.

Par exemple, les produits de recombinaison selon 15 la présente invention peuvent être fabriqués comme décrit ci-après. Un vecteur adapté contenant la séquence de base souhaitée pour la transcription, tel que notamment un clone d'ADN complémentaire d'OTBC, est traité avec des enzymes de restriction pour couper la séquence. On clone 20 alors l'ADN ainsi obtenu, dans une orientation inversée si on le souhaite, dans un second vecteur contenant la séquence promotrice souhaitée et la séquence de terminaison souhaitée. Comme promoteurs adaptés on peut citer le promoteur nommé 35S du virus du CaMV comme 25 exemple de promoteur considéré comme étant constitutif, le promoteur du gène de la polygalacturonase de tomate (voir Bird et al., 1998, Plant Molecular Biology, 11:651-662) comme exemple de promoteur impliqué dans la régulation des fruits, ou encore le promoteur du gène de la petite sous- 30 unité de la ribulose bis-phosphate carboxylase comme exemple de promoteur exprimé dans les tissus verts. Les séquences de terminaison comprennent le terminateur NOS du gène nopaline synthase.

Il peut être intéressant de modifier l'activité 35 enzymatique de la plante durant seulement le développement et/ou le mûrissement des fruits. L'utilisation d'un

promoteur constitutif tendra à modifier le taux et l'activité des enzymes dans toutes les parties de la plante transformée, alors que l'utilisation d'un promoteur spécifique à un tissu contrôlera de manière plus sélective 5 l'expression du gène et modifiera l'activité, par exemple la coloration des fruits. De ce fait, en mettant en oeuvre l'invention, par exemple dans des poivrons, il sera adapté d'utiliser un promoteur qui permettra l'expression spécifique au cours du développement et/ou le mûrissement 10 des fruits. Enfin, l'ARN sens ou anti-sens sera alors produit seulement dans les organes de la plante où l'on souhaite qu'il y ait une action. Comme promoteurs spécifiques de développement et ou de mûrissement des fruits qui peuvent être utilisés, on peut citer le 15 promoteur de stimulation de la polygalacturonase (Demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 92/08798), le promoteur E8 (Dieckman & Fischer, 1998, EMBO, 7:3315-3320) et le promoteur spécifique des fruits 2A11 (Pear et al., 1989, Plant Molecular biology, 13: 639-651).

20 Un douzième objet selon l'invention concerne une cellule de plante transformée par un vecteur défini dans le dixième ou le onzième objet selon l'invention.

L'homme de l'art dans la technique du génie génétique végétal connaît bien aujourd'hui les différentes 25 techniques d'obtention de plantes génétiquement modifiées. On sait que la paroi végétale constitue une barrière mécanique naturelle particulièrement efficace à la pénétration de tout matériel étranger dans la cellule et, en particulier, à celle d'ADN. Les différents techniques 30 spécifiques d'introduction de l'ADN dans la cellule végétale sont par exemple l'utilisation de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, l'électroporation de protoplastes, la micro-injection d'ADN nu, l'utilisation de canon à particules ou biolistique, ou la transformation 35 de protoplastes.

Afin de pouvoir sélectionner les cellules effectivement transformées, on introduit, en plus du gène codant pour le caractère que l'on recherche, un gène marqueur. On choisira préférentiellement un gène conférant 5 une résistance à un antibiotique. Les cellules sont alors sélectionnées par culture sur un milieu contenant cet antibiotique. Seules les cellules possédant le gène de résistance pourront se multiplier. La présence du gène d'intérêt peut également être vérifiée par hybridation 10 avec de l'ADN complémentaire de l'ADN introduit.

Le produit de recombinaison selon l'invention est transféré à l'intérieur d'une cellule de plante cible. La cellule de plante cible peut être une partie d'une plante complète ou peut être une cellule isolée ou partie d'un 15 tissu qui peut être régénéré à l'intérieur d'une plante complète. La cellule de plante cible peut être choisie parmi toute espèce de plante monocotylédone ou dicotylédone. Les plantes adaptées comprennent toute plante portant des fruits, telles que notamment les 20 tomates, les mangues, les pêches, les pommes, les poires, les fraises, les bananes, les melons, les poivrons, les piments, le paprika, les plantes ayant des feuilles, des fleurs ou tout autre organe dans lesquels on souhaite modifier le contenu en caroténoides.

25 Les produits de recombinaison selon l'invention peuvent être utilisés pour transformer toute plante, en utilisant toute technique adaptée pour transformer des plantes selon l'invention. Les cellules des plantes monocotylédones et dicotylédones peuvent être transformées 30 de différentes manières connues par l'homme de l'art. Dans la plupart des cas, les cellules de ces plantes, particulièrement lorsque ce sont des cellules de plantes dicotylédones, peuvent être mise en culture pour générer une plante entière qui se reproduit par la suite en 35 engendrant des générations successives de plantes modifiées génétiquement. Tout procédé adapté pour la

transformation des plantes peut être utilisé. Par exemple, les plantes dicotylédones, telles que la tomate et le melon, peuvent être transformées en utilisant le plasmide Ti Agrobacterium. De telles plantes transformées peuvent 5 se reproduire par croisement, ou par culture de cellule ou de tissu.

Un treizième objet selon l'invention concerne une plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétale, feuille, comprenant des cellules définies 10 selon le douzième objet de l'invention.

Les plantes ou fragments de plantes, génétiquement modifiées selon l'invention avec un vecteur comprenant une séquence sens, notamment pour augmenter la production de caroténoides, comprennent un taux élevé en précurseur de 15 la vitamine A par rapport au taux normal produit par la plante.

Les caroténoides, outre leur rôle dans la couleur de la plante, ont également un rôle de protection des plantes contre les dommages que peut produire une haute 20 intensité lumineuse. De ce fait, les plantes, contenant par modification génétique un taux plus élevé de ces caroténoides, peuvent présenter un grand intérêt pour les régions où la culture s'effectue avec des changements de température importants.

Les plantes modifiées génétiquement peuvent 25 présenter des couleurs différentes, selon que l'on ait augmenté ou diminué la synthèse des caroténoides. Plus particulièrement, les produits de recombinaison de l'OTBC peuvent être utilisés pour stimuler ou inhiber la 30 production des couleurs associées aux caroténoides produits lors des réactions de désaturation, par exemple le lycopène rouge, ou dérivés de produits comme la couleur jaune/orange associée au bêta-carotène. La stimulation de la production des bêta-carotènes, avec un produit de 35 recombinaison sens de sur-expression, peut permettre de produire des poivrons de couleur jaune/orange, ou bien une

couleur déterminée par un dérivé des bêta-carotènes tel qu'un rouge plus intense, du fait de la biosynthèse de capsorubine ou de capsanthine, ayant comme conséquence que le consommateur trouvera ces poivrons plus appétissants.

5 Comme exemple de plantes génétiquement modifiées selon la présente invention, on citera plus particulièrement les plantes portant des fruits. Les fruits de ces plantes peuvent donc être rendues plus attirantes pour le consommateur, en stimulant ou 10 intensifiant à l'intérieur une couleur spécifique. Comme autres plantes qui peuvent être modifiées génétiquement, on peut citer les tubercules tels que les radis, les navets et les pommes de terre, de même que les céréales tels que le maïs, le blé, l'orge et le riz.

15 Les plantes modifiées génétiquement selon l'invention, peuvent également contenir d'autres produits de recombinaison, par exemple des produits de recombinaison ayant d'autres effets, notamment sur le mûrissement des fruits. Par exemple, des fruits ayant une 20 couleur plus intense, modifiés selon la présente invention, peuvent également contenir des produits de recombinaison, soit qui inhibent la production de certaines enzymes telles que la polygalacturonase et la pectinestérase, soit qui interfèrent avec la production 25 d'éthylène. Les fruits qui contiennent ces deux types de produits de recombinaison peuvent être engendrés, soit par des transformations successives, soit en croisant deux variétés qui contiennent chacune un des produits de recombinaison, puis en sélectionnant parmi la descendance 30 ceux qui contiennent les deux produits de recombinaison.

Un quatorzième objet selon l'invention concerne un procédé pour modifier la production de caroténoides dans une plante, soit en augmentant la production de caroténoides, soit en abaissant ou inhibant la production 35 de caroténoides par la plante, relativement au contenu normal de caroténoides produits par la plante, ledit

procédé comprenant la transformation de cellules desdites plantes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième et le onzième objet selon l'invention.

Un quinzième objet selon l'invention concerne un 5 procédé pour produire des caroténoides dans une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur défini dans le dixième objet selon l'invention.

10 Les béta-carotènes, produits par un organisme eucaryote ou procaryote exprimant un produit de recombinaison codant pour l'enzyme OTBC, peuvent être extraits pour être utilisés en tant que colorant, anti-oxydant ou précurseur de la vitamine A.

15 La figure 1 présente la séquence d'ADNc et la séquence d'acides aminés correspondante de OTBC. Le potentiel peptide N-terminal de transit du chloroplaste est souligné. Le point probable de clivage est indiqué par une étoile (*). Les triangles ouverts indiquent la 20 position des introns.

La figure 2 montre la comparaison entre la protéine OTBC et la protéine AOX de la graine de soja. (+) indique les acides aminés similaires. Les acides aminés présentés dans une boîte font partie des domaines en 25 hélice transmambranaire prédicts. Les motifs de liaison du fer sont soulignés.

Exemple 1 : Détail du clonage du locus codant pour la protéine OTBC

30

1- Isolement du mutant.

On a provoqué la mutation par l'utilisation d'un transposon introduit dans le génome de la plante *Arabidopsis thaliana* cultivar *landsberg-erecta*.

35 Cette technique est largement décrite dans une référence (Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne,

J., Puangsomlee P., and Coupland, G. (1993) The maize transposable element system Ac/ Ds as a mutagen in *Arabidopsis* :Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. Pro. Natl. Science USA, 10, 10370-10374) 5 et a été effectuée par d'autres au laboratoire de George Coupland au John Innes Centre for Plant Science, Colney, Norwich, NR4 7UH, Nordwich, Grande-Bretagne.

La transposition de l'élément transposable Dissociator (Ds) utilisé ici a été déclenchée par la 10 production de la protéine transposase (ou Transposase de l'élément Activator, Ac).

Parmi la descendance d'une plante ayant subi la transposition de l'élément Ds, on a identifié plusieurs 15 plantes à l'aspect mutant albinos, différent du sauvage par l'absence de pigmentation verte (chlorophylle). On a également identifié des plantes d'aspect sauvage mais qui transmettent la mutation à leur descendance. Ces plantes sont identifiées comme hétérozygotes, portant la mutation sur un seul chromosome. Les plantes homozygotes ont un 20 phénotype mutant et portent la mutation sur les deux chromosomes homologues.

2-Test de Liaison de la mutation à l'élément transposable Ds.

Cette expérience a été faite dans le but de 25 prouver que la mutation observée est causée par l'insertion de l'élément Ds dans un gène nécessaire au bon fonctionnement de la plante et à son aspect sauvage.

L'élément transposable, ou transposon, Ds est construit de façon à porter un gène de résistance à 30 l'antibiotique hygromycine (décrit dans les références précédentes). On a fait pousser la descendance de 35 plantes hétérozygotes qui portent la mutation albinos sur un milieu gélosé contenant une dose létale d'hygromycine, toutes les plantes qui portent la mutation sont aussi 35 résistantes à l'hygromycine. On en tire la conclusion que

la mutation est liée au gène de résistance porté par le transposon.

On a isolé une portion d'ADN de plante résistante à l'antibiotique hygromycine, jouxtant le transposon. Ceci 5 a été fait selon la méthode IPCR ou PCR-inverse décrite dans les références précédentes.

Par expérience dite de "Southern blot", on a remarqué que les lignées qui portent la mutation ont une altération de l'ADN génomique. Cette altération est 10 révélée lorsque l'on utilise comme "sonde" la portion d'ADN isolée jouxtant le transposon.

3- Isolement du gène

On a, en utilisant une méthode de criblage de banque d'ADN génomique, isolé un clone contenant un 15 fragment d'ADN génomique pouvant contenir la version sauvage inaltérée du gène interrompu chez le mutant.

La banque d'ADN criblée a été construite par d'autres, elle est décrite dans publication de Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol P., Anderson, M.L., 20 Cowl, J.S. & Harberd, N.P. (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *The Plant Cell* 5, 757-768.

Nous avons déterminé la séquence totale d'un fragment de restriction obtenu par digestion enzymatique 25 du clone d'ADN génomique par l'enzyme EcoR I. La séquence obtenue couvre 3000 paires de bases. Parmi ces 3000 paires de base, on trouve une partie identique à la séquence du fragment bordure préalablement isolé, confirmant l'identité entre l'ADN isolé et le gène interrompu par le 30 transposon.

4- Isolement et caractérisation de la séquence codante.

Nous avons utilisé une banque d'ADNc, qui est une banque commerciale vendue par CLONTECH Laboratories, Inc.. 35 Il s'agit d'une banque d'ADNc faite à partir d'ARNm

extrait d'*Arabidopsis thaliana*, transformés en ADNC, puis clonés dans le vecteur plasmidique pGAD10.

A partir de cette banque de données d'ADNC, et selon les techniques habituelles, utilisant le gène 5 identifié précédemment comme sonde, nous avons isolé plusieurs clones contenant un ADNC d'une taille d'environ 1400 paires de bases.

Nous avons déterminé la séquence totale de l'ADNC et avons montré qu'il est entièrement compris dans le 10 fragment d'ADN génomique préalablement identifié. Nous avons placé la partie codante (ou exons) et la partie non codante (introns) du gène sur la séquence du gène. Le gène porte 9 exons et 8 introns. L'insertion du transposon Ds est identifiée au début du deuxième exon et vient donc 15 interrompre la partie codante du gène.

La séquence de l'ADNC présente un potentiel codon de départ suivi par un cadre de lecture ouvert de 350 acides aminés, codant pour une protéine potentielle de 39 kDa que nous avons nommé OTBC. Une recherche d'homologie 20 en utilisant le programme blastp ((Altshul et al. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402) a révélé une homologie faible mais significative avec des polypeptides appartenant à la famille des 25 protéines oxydase alternative ou terminale oxydase de mitochondries (AOX). Aucune autre homologie significative n'a été trouvée. L'homologie commence à l'acide aminé 111 et présente 29% d'identité (45% de similarité) avec la 30 protéine AOX, une recherche par ordinateur de structures secondaires et des domaines potentiels de la signification biologique ont révélé une similarité structurale entre la protéine OTBC et AOX. Des domaines en hélice transmembranaire trouvés dans AOX sont situés à des 35 positions similaires sur la séquence peptidique de l'OTBC, suggérant une localisation membranaire de OTBC et

également une configuration similaire à AOX dans la membrane. De plus, un motif de liaison du fer se trouve conservé entre OTBC et AOX. L'alignement des séquences entre les protéines OTBC et AOX montre une insertion de 19
5 acides aminés dans la protéine OTBC qui correspond à une partie des exons 7 et 8.

La séquence N-terminale de la protéine OTBC présente les caractéristiques d'un peptide de transit du chloroplaste, qui est riche en leucine, arginine et
10 sérine/thréonine. Une analyse par ordinateur du potentiel peptide de transit (psort software, Nakai and Kanehisa, 1992) a suggéré une cible possible de OTBC au niveau des compartiments des thylakoides du chloroplaste.

5- Identification de la mutation.

15 L'aspect du mutant est proche de celui d'un mutant déjà décrit dans la littérature: le mutant "immutans", Wetzel C.M., Jiang C-Z., Meehan L.J., Voytas D.L., Rodermel S.R. (1994) Nuclear-organelle interactions: the immutans variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid
20 autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis, Plant Journal 6, 161-175.

25 Nous avons croisé le mutant "immutans" (allèle spotty, référence précédente) avec celui que nous avons isolé. La descendance du croisement est d'aspect mutant, ce qui est un résultat attendu si les deux mutations affectent le même gène. Nous pouvons affirmer que le gène identifié correspond à la version sauvage du locus IMMUTANS et que le mutant obtenu porte une version interrompue du gène dont le produit est alors inactif.

30

Exemple 2 : Construction d'un vecteur de l'invention par introduction d'ADNc codant pour l'OTBC de poivron dans un vecteur d'expression de plantes

Le vecteur pBI121 (commercialisé par Clontech laboratories, Inc) est un vecteur adapté à cette construction.

Il comporte une région T-DNA que la bactérie 5 *Agrobacterium tumefaciens* peut transférer dans le génome des plantes.

Cette région T-DNA comporte entre autre un promoteur constitutif (le promoteur nommé 35S du virus CaMV), le gène GUS suivi du terminateur NOS (du gène 10 nopaline synthase). Le gène GUS ne présentant aucun intérêt dans l'invention est remplacé par un ADNC codant pour l'OTBC. Cet ADNC sera donc placé sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur NOS.

Tout autre promoteur constitutif ou non (dans ce 15 dernier cas, il devra être spécifique de l'organe dont on souhaite modifier les propriétés) et tout autre terminateur sont également utilisables.

Un ADNC codant pour l'OTBC a été sous-clonés originellement dans le site de restriction NotI du 20 plasmide bactérien pBluescriptKS : il a ainsi été flanqué de sites de coupures BamH1 en 5' et SacI en 3'.

Cet ADNC est excisé du plasmide pBluescriptKS par les enzymes de restriction BamH1 et SacI. Ce fragment 25 BamH1-SacI est inséré dans le vecteur pBI121 lui-même coupé par ces enzymes : le site BamH1 se trouve en 3' du promoteur 35S et en 5' du gène GUS, le site SacI se trouve en 3' du gène GUS et en 5' du terminateur NOS.

Après ligation, sont sélectionnés les dérivés du vecteur pBI121 dans lequel l'ADNC codant pour l'OTBC 30 (c'est-à-dire sans intron) a remplacé le gène GUS.

Exemple 3 : Transformation d'une cellule de plante pour obtenir une cellule transformée de l'invention.

35 Le vecteur de transformation de plante dérivé de pBI121 obtenu à l'exemple 2 est introduit dans la souche

d'Agrobacterium LBA4404 par électroporation. La souche recombinante est sélectionnée en présence de 50 µg/ml de kanamycine.

Cette souche transformée d'Agrobacterium est 5 utilisée pour la transformation de cellules de plantes, par exemple de tabac.

La technique utilisée à cet effet et qui peut être remplacée par toute autre technique de transformation, est celle de l'infection de disques foliaires de plantules de 10 tabac cultivées *in vitro*. Les cellules transformées de plantes sont sélectionnées en présence de kanamycine. Agrobacterium est éliminé par l'antibiotique céfotaxime. Les disques foliaires sont cultivés sur milieu de culture végétale en présence d'hormones végétales (auxine et 15 cytokinines) favorisant la croissance de cal. Les cals issus de la croissance des cellules transformées sont utilisés pour la régénération de plantes entières par les techniques classiques. Par exemple, les cals sont transférés sur milieu de culture végétale en présence de 20 cytokinine pour induire la formation de pousses. Celles-ci sont ensuite coupées et transférées sur milieu de culture végétale sans hormone afin de régénérer des racines. les antibiotiques kanamycine (afin de sélectionner la 25 croissance de tissus transformés) et céfotaxime (afin d'éliminer complètement Agrobacterium) sont maintenus pendant toutes ces phases de culture.

Les plantes transformées sont mises en culture stérilement en présence de kanamycine et céfotaxime puis sont transférées en terre et cultivées en serre jusqu'à la 30 récolte des graines. La présence du transgène a été confirmée par hybridation de l'ADN génomique de ces plantes avec une sonde spécifique issue du vecteur de transformation utilisé.

LISTE DE SEQUENCES**(1) INFORMATIONS GENERALES:****(i) DEPOSANT :**

5 (A) NOM : UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (Grenoble 1)
(B) RUE : CERMO - 460, RUE DE LA PISCINE - Domaine Universitaire
(C) VILLE : SAINT MARTIN D'HERES - GRENOBLE
(E) PAYS : FRANCE
(F) CODE POSTAL : 38400

10 (ii) TITRE DE L' INVENTION : ADN et ARNm correspondant, codant pour l'enzyme oxydase terminale associée à la biosynthèse des caroténoides (OTBC)

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 2

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR :

15 (A) TYPE DE SUPPORT : Floppy disk
(B) ORDINATEUR : IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION : PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL : PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO : 1 :**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :**

20 (A) LONGUEUR : 1396 paires de bases
(B) TYPE : nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS : simple

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(iv) ANTI-SENS : NON

(vi) ORIGINE :

25 (B) SOUCHE : *Arabidopsis thaliana*

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO : 1 :

5	CCGCTCACAT TGGGATTCGT CATTCTTCTT CTAACACCCG CAAAATTCT CCATTTCTAC	60
	CAAAAATATC CAACTTTAC TTTCTTCC TGTGAAATTA TCTGCTAAA TCTTGGTTC	120
10	CTGACGGAGA TGGCGGCGAT TTCAGGCATC TCCTCTGGTA CGTTGACGAT TTCACGGCCT	180
	TTGGTTACTC TTGACGCTC TAGAGCCGCC GTTCTGACA GCTCCTCTCA CCGATTGCTT	240
15	CATCATCTTC CTCTCTCTTC TCGTCGTCTG CTATTAAGGA ACAATCATCG AGTCCAAGCA	300
	ACGATTTGC AAGACGATGA AGAGAAAGTG GTGGTGGAGG AATCGTTAA AGCCGAGACT	360
20	TCTACTGGTA CAGAACCACT TGAGGAGCCA AATATGAGTT CTTCTCAAC TAGTGCTTT	420
	GAGACATGGA TCATCAAGCT TGAGCAAGGA GTGAATGTTT TCCTTACAGA CTCGGTTATT	480
25	AAGATACTTG ACACTTGTA TCGTGACCGA ACATATGCAA GTTCTTGT TCTTGAGACA	540
	ATTGCTAGAG TGCCTTATTG TCGCTTATG TCTGTGCTAC ATATGTATGA GACCTTGGT	600
	TGGTGGAGGA GAGCAGATTG TTGAAAGTA CACTTGCTG AGAGCTGGAA TGAAATGCAT	660
30	CACTTGCTCA TAATGGAAGA ATTGGGTGGA AATTCTTGGT GGTTGATCG TTTCTGGCT	720
	CAGCACATAG CAACCTTCTA CTACTTCATG ACAGTGTCT TGTATATCTT AAGCCTAGA	780
	ATGGCATATC ACTTTTCGGA ATGTGTGGAG AGTCATGCAT ATGAGACTTA TGATAAATT	840
35	CTCAAGGCCA GTGGAGAGGA GTGAAAGAAT ATGCCCTGCAC CGGATATCGC AGTAAAATAC	900
	TATACGGGAG GTGACTTGTA CTTATTGAT GAGTTCCAAA CATCAAGAAC TCCCAATACT	960
	CGAAGACCAAG TAATAGAAAA TCTATACGAT GTGTTGTGA ACATAAGAGA TGATGAAGCA	1020
40	GAACACTGCA AGACAATGAG AGCTTGTCAAG ACTCTAGGCA GTCTCGTTC TCCACACTCC	1080
	ATTTAGATG ATGATGATAC TGAAGAAGAA TCAGGGTGTG TTGTTCTGA GGAGGCTCAT	1140
	TGCGAAGGTA TTGTAGACTG CCTCAAGAAA TCCATTACAA GTTAATAAAT TAGAAAGTAA	1200
	ACTAAAAAAAG ATTATITGTA TCAGCTCATG ACAATAGAT ATAATCCCAT ATACTTGGGA	1260
45	ATAAAAGGAAT AATGTGAAAT TCCCATCGTT GTGCTAGTGT GTGAGAGAAAT CAAATACCCT	1320
	AATGATGTAA ATGACTTTG ATGAGCTTAA GTCGTTGTAG ACCATTTAT CAAAAAAA	1380
	AAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	1396

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO : 2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 351 acides aminés
- (B) TYPE : acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple

5 (ii) TYPE DE MOLECULE : protéine

(iv) ANTI-SENS : NON

(v) TYPE DE FRAGMENT : interne

(vi) ORIGINE :

- (B) SOUCHE : *Arabidopsis thaliana*

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO : 2 :

Met Ala Ala Ile Ser Gly Ile Ser Ser Gly Thr Leu Thr Ile Ser Arg				
1	5	10	15	
Pro Leu Val Thr Leu Arg Arg Ser Arg Ala Ala Val Ser Tyr Ser Ser				
15	20	25	30	
Ser His Arg Leu Leu His His Leu Pro Leu Ser Ser Arg Arg Leu Leu				
35	40	45		
Leu Arg Asn Asn His Arg Val Gln Ala Thr Ile Leu Gln Asp Asp Glu				
20	50	55	60	
Glu Lys Val Val Val Glu Glu Ser Phe Lys Ala Glu Thr Ser Thr Gly				
25	65	70	75	80
Thr Glu Pro Leu Glu Glu Pro Asn Met Ser Ser Ser Thr Ser Ala				
85	90	95		
Phe Glu Thr Trp Ile Ile Lys Leu Glu Gln Gly Val Asn Val Phe Leu				
30	100	105	110	
Thr Asp Ser Val Ile Lys Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Arg Asp Arg Thr				
115	120	125		
Tyr Ala Arg Phe Phe Val Leu Glu Thr Ile Ala Arg Val Pro Tyr Phe				
35	130	135	140	
Ala Phe Met Ser Val Leu His Met Tyr Glu Thr Phe Gly Trp Trp Arg				
145	150	155	160	

Arg Ala Asp Tyr Leu Lys Val His Phe Ala Glu Ser Trp Asn Glu Met
 165 170 175

His His Leu Leu Ile Met Glu Glu Leu Gly Gly Asn Ser Trp Trp Phe
 5 180 185 190

Asp Arg Phe Leu Ala Gin His Ile Ala Thr Phe Tyr Tyr Phe Met Thr
 195 200 205

10 Val Phe Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Arg Met Ala Tyr His Phe Ser Glu
 210 215 220

Cys Val Glu Ser His Ala Tyr Glu Thr Tyr Asp Lys Phe Leu Lys Ala
 15 225 230 235 240

Ser Gly Glu Glu Leu Lys Asn Met Pro Ala Pro Asp Ile Ala Val Lys
 245 250 255

Tyr Tyr Thr Gly Gly Asp Leu Tyr Leu Phe Asp Glu Phe Gln Thr Ser
 20 260 265 270

Arg Thr Pro Asn Thr Arg Arg Pro Val Ile Glu Asn Leu Tyr Asp Val
 275 280 285

25 Phe Val Asn Ile Arg Asp Asp Glu Ala Glu His Cys Lys Thr Met Arg
 290 295 300

Ala Cys Gin Thr Leu Gly Ser Leu Arg Ser Pro His Ser Ile Leu Asp
 30 305 310 315 320

Asp Asp Asp Thr Glu Glu Ser Gly Cys Val Val Pro Glu Glu Ala
 325 330 335

His Cys Glu Gly Ile Val Asp Cys Leu Lys Lys Ser Ile Thr Ser
 35 340 345 350

REVENDICATIONS

1. Séquence d'ADN, comprenant au moins une région codante constituée par:

5 - la séquence nucléotidique représentée par SEQ ID N° 1, transcrivant un ARNm, cet ARNm codant pour l'enzyme
Oxydase Terminale associée à la Biosynthèse des Caroténoides (OTBC) décrite par SEQ ID N°2,
10 - la séquence nucléotidique modifiée de la séquence SEQ ID N°1, telle que décrite ci-dessus, particulièrement par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou de plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm lui-même codant pour l'OTBC décrite par SEQ ID N°2, ou codant pour une protéine modifiée de ladite OTBC,
15 ladite protéine modifiée ayant une activité enzymatique équivalente à celle de l'OTBC décrite par SEQ ID N°2.

2. Séquence d'ADN comprenant au moins une région codante constituée par:

- la séquence nucléotidique complémentaire de
20 celle représentée par SEQ ID N°1, cette séquence
transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybridrer avec
l'ARNm codé par la séquence SEQ ID N° 1,

- la séquence nucléotidique modifiée de la séquence décrite ci-dessus, par mutation et/ou addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotide(s), cette séquence modifiée transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'hybrider avec un ARNm mentionné ci-dessus,

- un fragment de l'une des séquences nucléotidiques mentionnées ci-dessus, ledit fragment transcrivant un ARNm anti-sens capable de s'apparier avec l'ARNm codé par la séquence complémentaire de SEQ ID N°1.

3. ARNm transcrit à partir de la séquence d'ADN selon la revendication 1, et plus particulièrement 35 transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire représentée par SEQ ID N°1, ledit ARNm codant pour

l'enzyme OTBC décrite par SEQ ID N°2, ou pour un fragment ou une protéine modifiée de l'enzyme, et présentant une activité qui est équivalente à ladite enzyme dans la plante.

5 4. ARNm anti-sens transcrit à partir de la séquence d'ADN complémentaire selon la revendication 2, comprenant des nucléotides qui sont complémentaires de la totalité ou d'une partie des nucléotides constituant l'ARNm natif, et capables de s'hybrider avec ledit ARNm.

10 5. Protéine ayant l'activité de l'enzyme OTBC native décrite par SEQ ID N°2, ou toute protéine modifiée de ladite enzyme OTBC, particulièrement par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou tout fragment provenant de l'enzyme OTBC ou 15 d'une séquence modifiée de l'enzyme, ladite protéine modifiée ou fragment présentant une activité enzymatique équivalente à celle de l'enzyme OTBC.

6. Complexe formé entre un ARNm anti-sens selon la revendication 4, et un ARNm codant pour une enzyme OTBC 20 dans la plante.

7. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN selon la revendication 1, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une 25 séquence ARNm codant pour tout ou partie de l'enzyme OTBC, cette dernière ayant une activité enzymatique équivalente à l'enzyme OTBC de la plante.

8. ADN recombiné caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence d'ADN selon la revendication 30 2, ladite séquence étant insérée dans une séquence hétérologue, lesdites séquences transcrivant tout ou partie d'une séquence ARNm anti-sens capable de s'apparier avec un ARNm codant pour une enzyme OTBC dans la plante.

9. ADN recombiné selon la revendication 7 ou 8, 35 caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires pour contrôler l'expression de la séquence nucléotidique

insérée, particulièrement une séquence promotrice et une séquence de terminaison de transcription.

10. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour augmenter la biosynthèse des caroténoides, comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 selon la revendication 1, codant pour tout ou partie d'une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoides, décrite par SEQ ID N°2, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le vecteur puisse générer de l'ARNm dans les cellules des plantes.

11. Vecteur de transformation de plantes, adapté pour diminuer ou arrêter la biosynthèse des caroténoides, comprenant tout ou partie du brin de la séquence nucléotidique complémentaire de SEQ ID N°1 selon la revendication 2, précédé par une origine de réPLICATION de la transcription des plantes, de manière à ce que le brin complémentaire transcrit puisse s'apparier à l'ARNm codant pour l'enzyme OTBC de la plante impliquée dans la synthèse des caroténoides.

12. Cellule de plante transformée par un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

13. Plante, ou fragment de plante, particulièrement fruit, graine, pétaLE, feuille, comprenant des cellules selon la revendication 12.

14. Procédé pour modifier la production de caroténoides dans une plante, soit en augmentant la production de caroténoides, soit en abaissant ou inhibant la production de caroténoides par la plante, relativement au contenu normal de caroténoides produits par la plante, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites plantes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10 ou 11.

15. Procédé pour produire des caroténoides dans une cellule de plante, ou eucaryote ou procaryote, ledit procédé comprenant la transformation de cellules desdites

plantes, des cellules eucaryotes ou procaryotes à transformer avec un vecteur selon la revendication 10.

FIG 1

1/2

1 CCG CTC ACA TTG GGA TTC GTC ATT CTT CTT CTA AAA CCC GCA AAA TTT CTC CAT TTC TAC
 61 CAA AAA TAT CCA ACT TTT ACT TTT CTT TCC TGT GAA ATT ATC TGC TCA AAT CTT TGG TTC
 121 CTG ACG GAG ATG GCG GCG ATT TCA GGC ATC TCC TCT GGT ACG TGT ACG ATT TCA CGG CCT
 M A A I S G I S S G T L T I S R P
 181 TTG GTT ACT CTT CGA CGC TCT AGA GCC GCC GTT TCG TAC AGC TCC TCT CAC CGA TTG CTT
 L V T L R R S R A A V S Y S S S H R L L
 241 CAT CAT CTT CCT CTC TCT CGT CGT CTG CTA TTA AGG AAC AAT CAT CGA GTC CAA GCA
 H H L P L S S R R L L L R N N H R V O A
 301 ACG ATT TTG CAA GAC GAT GAA GAG AAA GTG GTG GTG GAG GAA TCG TTT AAA GCC GAG ACT
 T I L Q D D E E K V V V E E S F K A E T
 361 TCT ACT GGT ACA GAA CCA CTT GAG GAG CCA AAT ATG AGT TCT TCT TCA ACT AGT GCT TTT
 S T G T E P L E E P N M M S S S S T S A F
 421 GAG ACA TGG ATC ATC AAG CTT GAG CAA GGA GTG AAT GTT TTC CTT ACA GAC TCG GTT ATT
 E T W I I K L E Q G V N V F L T D S V I
 481 AAG ATA CTT GAC ACT TTG TAT CGT GAC CGA ACA TAT GCA AGG TTC TTT GTT CTT GAG ACA
 K I L D T L Y R D R T Y A R F F V L E T
 541 ATT GCT AGA GTG CCT TAT TTT GCG TTT ATG TCT GTG CTA CAT ATG TAT GAG ACC TTT GGT
 I A R V P Y F A F M S V L H M Y E T F G
 601 TGG TGG AGG AGA GCA GAT TAT TTG AAA GTA CAC TTT GCT GAG AGC TGG AAT GAA ATG CAT
 W W R R A D Y L K V H F A E S W N E M H
 661 CAC TTG CTC ATA ATG GAA GAA TTG CGT GGA AAT TCT TGG TGG TTT GAT CGT TTT CTG GCT
 H L L I M E E L C G N S W W F D R F L A
 721 CAG CAC ATA GCA ACC TTC TAC TAC TTC ATG ACA GTG TTC TTG TAT ATC TTA AGC CCT AGA
 Q H I A T F Y Y F M T V F L Y I L S P R
 781 ATG GCA TAT CAC TTT TCG GAA TGT GTG GAG AGT CAT GCA TAT GAG ACT TAT GAT AAA TTT
 M A Y H F S E C V E S H A Y E T Y D K F
 841 CTC AAG GCC AGT GGA GAG GAG TTG AAG AAT ATG CCT GCA CCG GAT ATC GCA GTA AAA TAC
 L K A S G E E L K N M P A P D I A V K Y
 901 TAT ACG GGA GGT GAC TTG TAC TTA TTT GAT GAG TTC CAA ACA TCA AGA ACT CCC AAT ACT
 Y T G G D L Y L F D E F Q T S R T P N T
 961 CGA AGA CCA GTA ATA GAA AAT CTA TAC GAT GTG TTT GTG AAC ATA AGA GAT GAT GAA GCA
 R R P V I E N L Y D V F V N I R D D E A
 1021 GAA CAC TGC AAG ACA ATG AGA GCT TGT CAG ACT CTA GGC AGT CTG CGT TCT CCA CAC TCC
 E H C K T M R A C Q T L G S L R S P H S
 1081 ATT TTA GAT GAT GAT GAT ACT GAA GAA GAA TCA GGG TGT GTT GTT CCT GAG GAG GCT CAT
 I L D D D D T E E E S G C V V P E E A H
 1141 TGC GAA GGT ATT GTA GAC TGC CTC AAG AAA TCC ATT ACA AGT TAA TAA ATT AGA AAG TAA
 C E G I V D C L K K S I T S
 1201 ACT AAA AAA GAT TAT TTG TAT CAG CTC ATG AAC AAT AGA TAT AAT CCC ATA TAC TTG GGA
 1261 ATA AAG GAA TAA TGT GAA ATT CCC ATC GTT GTG CTA GTG TGT GAG AGA ATC AAA TAC CCT
 1321 AAT GAT GTA AAT GTA CTT TGA TGA GCT TAA GTC GTT GTA GAC CAT TTT ATC AAA AAA AAA
 1381 AAA AAA AAA AAA AAA A

FIG 2

IMM : 111 FLTDSVIKILDLYRDRYA-~~R~~ + T + + + I L+ R Y R +LET+A VP +LH+ + + + K 169
AOX : 136 YRTVKLLRIPDFFKRRYGCRA ~~AMM~~ VECWV ~~AMM~~ ~~AMM~~ HLRSSLRKFQQSGGWIKALL 195
2/2

IMM : 170 AESWNEMHILLIMEELGGNSWWFDR ~~E~~ + NE HL+ M EL W+ +R L + + + LYILSP+ +A+ +E 229
AOX : 196 EEAENERMHLLMTMVEL-VKPKWYER ~~E~~ + Y QGYREFFNAER ~~E~~ ~~E~~ ~~E~~ ~~E~~ SPKVAHRTIVGYLEEE 254

IMM : 230 AYETYDKFLK-ASGEELKNMPAPDIAVKKYYTGGDLYLDEFQTSRTPNTRRPVIEONLYDV 288
AOX : 255 AIHSYTEYLKDLESGAIENVPAPAIADYW-----RLPKDARLKDV 295

IMM : 289 FVNIRDDEAEH 299
IR DEA H

AOX : 296 ITVIRADEAHH 306